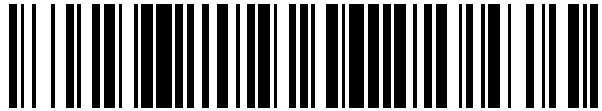


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 495**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/382 (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)
A61K 31/661 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2011 PCT/FR2011/052948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12080641**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2011 E 11811088 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2651408**

54 Título: **Agonistas de los receptores S1P y su utilización en el tratamiento de las infecciones por el VIH**

30 Prioridad:
13.12.2010 FR 1060432

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2018

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (100.0%)
3 rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR**

72 Inventor/es:
**FRANCOIS, VINCENT;
CORBEAU, PIERRE y
DUQUENNE, CHARLINE**

74 Agente/Representante:
VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 655 495 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agonistas de los receptores S1P y su utilización en el tratamiento de las infecciones por el VIH

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a compuestos que son agonistas de un receptor seleccionado entre los receptores S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 y S1PR5 para su uso en el tratamiento de infecciones por el VIH.

10 Estado de la técnica

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus que infecta a seres humanos y es el responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el cual está asociado a un sistema inmunitario debilitado, por lo que es vulnerable a muchas infecciones oportunistas. Transmitido por varios fluidos corporales: sangre, secreciones vaginales, semen o leche materna, el SIDA se considera actualmente una pandemia que causó la muerte a unos 25 millones de personas entre 1981 (fecha de la primera identificación de un caso de SIDA) y enero de 2006. Se estima que aproximadamente el 1 % de las personas de 15 a 49 años están infectadas con el VIH, sobre todo en el África subsahariana. Aunque existen tratamientos antirretrovirales contra el VIH que retrasan la aparición del SIDA, reduciendo la mortalidad y morbilidad, actualmente no existe ninguna vacuna ni cura.

Por tanto, existe una necesidad de nuevas moléculas para tratar eficazmente las infecciones por VIH.

Objeto de la invención

El VIH o HIV penetra en una célula diana mediante la unión de la proteína gp120 de la envoltura viral con el receptor CD4, enlace que permite la formación de un complejo ternario con el correceptor CCR5 (virus R5 trópico o VIH-R5). Esto conduce a la fusión de la envoltura viral a través de la proteína gp41 con la membrana celular, lo que permite la entrada del virus. El CCR5 es un receptor de quimiocinas presente en diferentes tipos de linfocitos, y pertenece a la familia de los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR). CCR5 es el principal co-receptor del VIH, tiene un interés fisiopatológico particular y es una diana terapéutica de elección.

Los inventores fueron capaces de demostrar que el receptor S1PR1 se heterodimeriza con el co-receptor CCR5 y disminuye la infectividad del VIH. Los inventores también han demostrado que los agonistas del receptor S1PR1 pueden disminuir la infección de las células por el VIH. Después de extensos y detallados estudios, los inventores también han demostrado que los agonistas de los receptores S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 y S1PR5 son susceptibles de disminuir la infección por VIH.

Sin estar ligado por la teoría, los inventores contemplan varias hipótesis para explicar el funcionamiento de los agonistas de la invención.

Una primera hipótesis es que el agonista mediante la unión a un receptor S1PR, promueve la internalización del heterodímero S1PR1-CCR5, como se ha propuesto para el receptor S1PR1 solo por Markus H. Gräler en Cell Physiol Biochem 2010; 26: 79-86 para explicar la inmunomodulación inducida por el agonista FTY720-P. Esta internalización del heterodímero S1PR1-CCR5, por tanto, disminuirá la cantidad de co-receptor CCR5 en la superficie de la célula, lo que explica la disminución de la infección por el VIH.

Una segunda hipótesis es que la estimulación de un receptor S1PR inducida por la unión del agonista disminuiría la señalización del receptor CCR5. Este fenómeno, llamado heterodesensibilización, es bien conocido. Por lo tanto, la activación de un receptor S1PR, a través de su efecto "inhibidor" de CCR5, podría influir en la infección y la propagación del VIH. Dicho efecto anti-VIH fue notablemente documentado en el caso de la estimulación de CXCR1 por la interleucina-8 (Richardson et al., 2003. J Biol Chem 278:15867-15873), de RPF por el péptido bacteriano fMLF (Shen, W. et al., Blood 2000. 96:2887-2894) y de A2A por la adenosina (Zhang et al., Blood 2006 108:38-44).

Una tercera hipótesis es que la estimulación de un receptor S1PR inducida por la unión del agonista alteraría la interacción de CCR5 con CD4 o gp120, lo que llevaría a una disminución de la infección de las células por el virus.

Finalmente, a la luz de los resultados obtenidos con el virus VIH-1 cuya envoltura se sustituye por el del virus de la estomatitis vesicular (VSVG) y por lo tanto penetra en la célula por endocitosis y con independencia de CCR5, los inventores han postulado una cuarta hipótesis. Esta última se basa en la posibilidad de que la señalización inducida por la unión de un agonista a su receptor S1PR estimularía esta vía de transducción de este receptor de una manera que interfiere con el ciclo de replicación del VIH por un mecanismo independiente de CCR5.

Por consiguiente, la invención se refiere a compuestos de FTY720 y FTY720-P que son agonistas de receptor S1PR1 para su uso en los métodos de tratamiento de las infecciones por el VIH en seres humanos.

65

Descripción detallada de la invención

Por "agonista del receptor de la esfingosina-1-fosfato" o agonista de un receptor S1PR", se entiende un compuesto que se une a al menos un receptor de la esfingosina-1-fosfato seleccionado de S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5.

Más específicamente, por "agonista del receptor S1PR1" se entiende un compuesto que se une al receptor S1PR1 y que, por ejemplo, da como resultado la internalización del receptor y/o la disociación del heterotrímero intracelular de las proteínas G en G α -GTP y G $\beta\gamma$ y/o un aumento de la fosforilación del receptor y/o la activación de la vía de señalización del receptor. Este término abarca los llamados agonistas "completos" y los llamados agonistas "parciales" del receptor de esfingosina-1-fosfato.

En lo sucesivo, las expresiones "receptor S1PR1" y "receptor S1P1" se utilizan indistintamente.

Según la invención, por el término "tratamiento" o "tratar" se entiende la acción de eliminar, reducir, inhibir la progresión o prevenir la aparición de la afección o enfermedad a la que se aplica tal término; o la acción de eliminar, reducir, inhibir la progresión o prevenir la aparición de uno o más síntomas de la afección o enfermedad a la que se aplica tal término.

Según la invención, por "infección por el VIH" o "infección por el HIV", se entiende una infección de cualquier tipo, grupo o clado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De hecho, el VIH es un virus que tiene una gran variabilidad genética y por lo tanto tiene una gran diversidad. El VIH puede ser de dos tipos: el VIH-1, el más presente en el mundo, o el VIH-2, menos patógeno que el VIH-1. Este comprende el VIH-2A y el VIH 2B. Dentro de cada tipo hay varios grupos los cuales a su vez, incluyen clados. El VIH-1 se clasifica en cuatro grupos: el grupo M (del inglés *major*), el grupo O (del inglés *outlier*), N (del inglés *new no-M, no-O*) y el grupo P. En 2005, el grupo M era ampliamente predominante con más de 40 millones de personas infectadas, frente a un poco más de 500 para el grupo O y solo 7 para el grupo N. El grupo M comprende nueve subtipos o clados (de A a D, de F a H, J y finalmente, K). Se añaden varias formas recombinantes (en Inglés "forma recombinante circulante" o CRF), que se originan de la infección múltiple de una célula por diferentes subtipos, lo que da como resultado mezclas en el genoma viral.

Agonistas de los receptores de esfingosina-1-fosfato (S1PR)

La descripción se refiere a un compuesto que es un agonista de al menos un receptor de la esfingosina-1-fosfato para su uso en métodos de tratamiento de infecciones por el VIH en seres humanos o animales. La invención se refiere a un compuesto que es un agonista de al menos un receptor seleccionado de los receptores S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 y S1PR5 para su uso en un método de tratamiento de la infección por el VIH en seres humanos, caracterizado por que dicho compuesto es FTY720 o FTY720-P.

El S1PR1 (o S1P1) tiene una secuencia de 382 aminoácidos, disponible con el número de acceso NP_001391.2 en la base de datos del NCBI. Esta secuencia está representada por la SEQ ID NO: 1.

El S1PR2 (o S1P2) tiene una secuencia de 353 aminoácidos disponible con el número de acceso NP_001391 en la base de datos del NCBI. Esta secuencia está representada por la SEQ ID NO: 2. El S1PR3 (o S1P3) tiene una secuencia de 378 aminoácidos disponible con el número de acceso NP_005217 en la base de datos del NCBI. Esta secuencia está representada por la SEQ ID NO: 3. El S1PR4 (o S1P4) tiene una secuencia de 384 aminoácidos disponible con el número de acceso NP_003766 en la base de datos del NCBI. Esta secuencia está representada por la SEQ ID NO: 4. El S1PR5 (o S1P5) está presente en forma de dos isoformas.

La primera isoforma tiene una secuencia de 310 aminoácidos disponible con el número de acceso AAH67781 en la base de datos del NCBI. Esta secuencia está representada por la SEQ ID NO: 5. La segunda isoforma tiene una secuencia de 398 aminoácidos disponible con el número de acceso NP_001159687 en la base de datos del NCBI. Esta secuencia está representada por la SEQ ID NO: 6.

Los agonistas de los receptores de la esfingosina-1-fosfato (S1PR) son conocidos de la técnica anterior y el experto en la materia tiene suficiente conocimiento general para identificar compuestos que son agonistas de un receptor S1PR. Para ello, se puede aplicar una prueba funcional de unión ³⁵S-GTP γ S in vitro. Por ejemplo, puede consultarse la publicación DS. Im et al., Mol. Pharmacol. 2000; 57-753. En esta prueba funcional, el enlace entre el GTP γ S y las proteínas G mediado por el ligando se mide en tampón de unión de GTP (en mM: 50 HEPES, 100 NaCl, 10 MgCl₂, pH 7,5) usando 25 μ g de una membrana preparada a partir de células HEK293 transfectadas transitoriamente. El ligando se añade a las membranas en presencia de 10 μ M de GDP y 0,1 nM de ³⁵S-GTP γ S (1200 Ci/mmol) y se incubaron a 30 °C durante 30 minutos. El GTP γ S unido es separado del GTP γ S no unido por un colector Brandel (Gaithersburg, MD) y se hace un recuento con el contador de centelleo líquido. Generalmente, el compuesto según la invención se selecciona del grupo que comprende la esfingosina-1-fosfato, FTY720, FTY720-P, AUY954, CYM-5442, CYM-5181, SEW2871, VPC01091, DS-SG-44, KRP-203-P, DihidroS1P, compuesto 26, compuesto 12, esfingosilfosforilcolina y AFD-R.

También se describe un compuesto que es un agonista de al menos dos receptores seleccionados de los receptores S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 y S1PR5 para su uso en un método de tratamiento de la infección por VIH en seres humanos o animales. Generalmente, dicho compuesto es un agonista de al menos:

- 5 > los receptores S1PR1 y S1PR2; o
- > los receptores S1PR1 y S1PR3; o
- > los receptores S1PR1 y S1PR4; o
- > los receptores S1PR1 y S1PR5; o
- > los receptores S1PR2 y S1PR3; o
- 10 > los receptores S1PR2 y S1PR4; o
- > los receptores S1PR2 y S1PR5; o
- > los receptores S1PR3 y S1PR4; o
- > los receptores S1PR3 y S1PR5; o
- > los receptores S1PR4 y S1PR5.

15 El compuesto se selecciona de los compuestos mencionados en la siguiente tabla:

COMPUESTOS	AGONISTA DE S1PR1	AGONISTA DE S1PR2	AGONISTA DE S1PR3	AGONISTA DE S1PR4	AGONISTA DE S1PR5
Esfingosina-1-fosfato	X	X	X	X	X
FTY720-P	X		X	X	X
AUY954	X		X		X
VPC01091	X			X	X
DS-SG-44	X	X	X		
KRP-203-P	X			X	
DihidroS1P	X	X	X	X	X
Compuesto 26	X		X	X	X
Compuesto 12				X	X
Esfingosilfosforilcolina	X	X	X	X	X
AFD-R	X		X	X	X

Agonistas de S1PR1

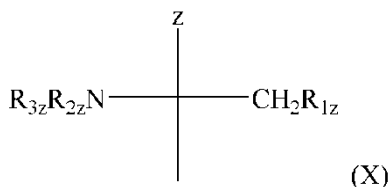
- 20 Dicho agonista es un agonista del receptor S1PR1. Generalmente, es un agonista de bajo peso molecular, por ejemplo una molécula orgánica pequeña (natural o no). La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula, natural o no, de un tamaño comparable al de las moléculas orgánicas generalmente utilizadas como medicamentos. Esta expresión excluye a las macromoléculas (por ejemplo, proteínas, moléculas de ácido nucleico, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas tienen un tamaño como máximo de 10.000 Da, preferiblemente como máximo de 5.000 Da, más preferiblemente como máximo de 2.000 Da, incluso más preferiblemente como máximo de 1.000 Da.

Los receptores de la esfingosina-1-fosfato son conocidos. Entre estos receptores, el S1PR1 o "receptor de la esfingosina-1-fosfato 1" está ampliamente descrito en la bibliografía. Este es un receptor que pertenece a la familia de los receptores acoplados a las proteínas G, cuyo ligando natural es la esfingosina-1-fosfato (S1P). El S1PR1 también es conocido por los siguientes nombres: EDG1, S1P1, ECGF1, EDG1, CHEDG1, D1S3362, FLJ58121. Se expresa de forma ubicua y su supresión genética en ratones ha demostrado su papel clave en la angiogénesis y maduración vascular, y en la regulación del reclutamiento de células inmunitarias (Takabe et al., Pharmacol Rev 2008 June; 60(2):181-195). La participación de la esfingosina-1-fosfato en el cáncer también ha sido descrita por Weng In Leong et al., Biochimie, 92 (2010) 716-723.

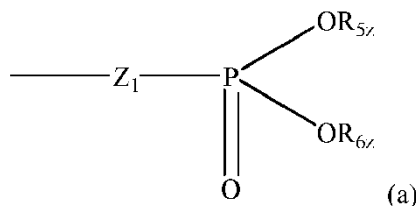
Los agonistas del receptor S1PR1 también se describen ampliamente en numerosas revistas científicas. Cabe citar en particular, la revisión de Dong-Soon IM publicada en Acta Pharmacologica Sínica (2010) 31: 1213-1222. También se pueden citar las solicitudes de patente EP1905434A1 o WO2010/075239A1 que describen diversas clases de agonistas.

Los agonistas del receptor S1PR1 son generalmente análogos de la esfingosina, tal como derivados del 2-amino-1,3-propanodiol 2-sustituido o derivados del 2-amino-propanol. Los agonistas del receptor S1PR1 son compuestos que comprenden generalmente un grupo de fórmula X

45



en la que Z es H, alquilo_{C1-6}, alqueno_{C2-6}, alquino_{C2-6}, fenilo, fenilo sustituido por OH, alquilo_{C1-6} sustituido por 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, cicloalquilo_{C3-8}, fenilo y fenilo sustituido por OH; o CH₂-P_{4z} donde P_{4z} es OH, aciloxi o un residuo de fórmula (a)



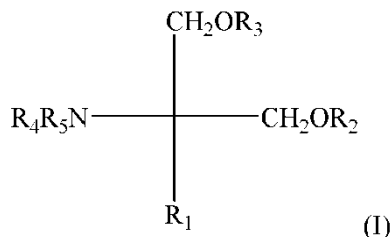
donde Z₁ es un enlace directo u O, preferiblemente O;
 cada uno de R_{5z} y R_{6z}, independientemente, es H, o alquilo_{C1-4} opcionalmente sustituido por 1, 2 o 3 átomos de halógeno;
 R_{1z} es OH, aciloxi o un residuo de fórmula (a); y cada uno de R_{2z} y R_{3z}, independientemente, es H, alquilo_{C1-4} o acilo.

El grupo de fórmula (X) es un grupo funcional que está unido como un grupo terminal a un grupo que puede ser hidrófilo o lipófilo y puede comprender uno o más residuos alifáticos, alicíclicos, aromáticos y/o heterocíclicos. La molécula resultante actúa como un agonista de un receptor S1PR1.

Preferiblemente, al menos uno de Z y R_{1z} es o comprende un residuo de fórmula (a).

Los ejemplos de agonistas de receptor S1PR1 comprenden:

(i) los compuestos descritos en el documento EP627406A1, por ejemplo un compuesto de fórmula I:



donde R₁ es una cadena C₁₂₋₂₂ lineal o ramificada

- que puede tener en la cadena un enlace o un heteroátomo seleccionado de un enlace doble, un enlace triple, O, S, NR₆, donde R₆ es H, alquilo_{C1-4}, aril-alquilo_{C1-4}, acilo o (alcoxi_{C1-4})carbonilo, y carbonilo, y/o
- que puede tener como sustituyente alcoxi_{C1-4}, alqueno_{C2-4}, alquino_{C2-4}, arilalquilo_{C1-4}-oxi, acilo, alquilamino_{C1-4}, alquilo_{C1-4}, acilamino, (alcoxi_{C1-4})carbonilo, (alcoxi_{C1-4})carbonilamino, aciloxi, (alquilo_{C1-4})carbamoilo, nitro, halógeno, amino, hidroximino, hidroxilo o carboxilo;

o R₁ es

- un fenilalquilo donde alquilo es una cadena de carbono lineal o ramificada C₆₋₂₀; o
- un fenilalquilo donde alquilo es una cadena de carbono lineal o ramificada C₁₋₃₀ donde dicho fenilalquilo está sustituido por
 - o una cadena de carbono lineal o ramificada C₆₋₂₀ opcionalmente sustituido por un halógeno,
 - o una cadena alcoxi lineal o ramificada C₆₋₂₀ opcionalmente sustituido por un halógeno,
 - o una cadena alqueno_{C2-4} lineal o ramificada C₆₋₂₀,
 - o un fenil-alcoxi_{C1-14}, halofenil-alcoxi_{C1-4}, fenil-alcoxi-C₁₋₁₄-alquilo C₁₋₁₄, fenoxi-alcoxi_{C1-4} o fenoxi-alquilo C₁₋₄,
 - o un cicloalquilalquilo sustituido por un alquilo_{C6-20},
 - o un heteroarilalquilo sustituido por un alquilo_{C6-20},
 - o un alquilo_{C6-20} heterocíclico, o
 - o un alquilo heterocíclico sustituido por un alquilo_{C2-20},

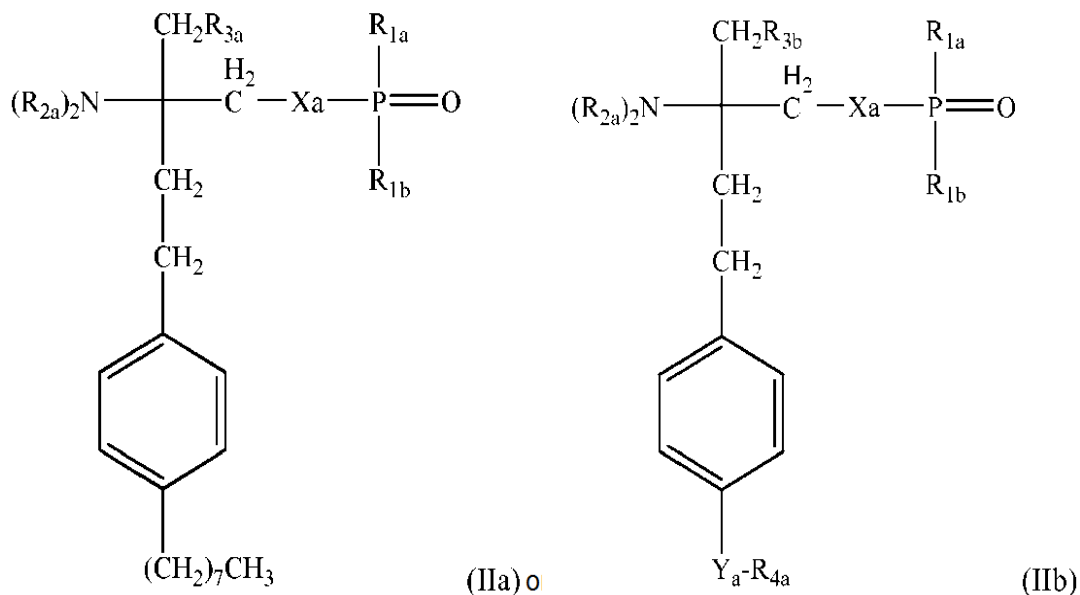
y donde el grupo alquilo puede tener:

- en la cadena de carbono, un enlace o un heteroátomo seleccionado de un enlace doble, un enlace triple, O, S, sulfinilo, sulfonilo, o NR₆, donde R₆ es como se define anteriormente, y

- como sustituyente, alcoxiC₁₋₄, alqueniloxiC₂₋₄, alquiniloxiC₂₋₄, arilalquiloC₁₋₄-oxi, acilo, alquilaminoC₁₋₄, alquiltioC₁₋₄, acilamino, (alcoxiC₁₋₄)carbonilo, (alcoxiC₁₋₄)-carbonilamino, aciloxi, (alquilC₁₋₄) carbamoilo, nitro, halógeno, amino, hidroxilo o carboxi; y

5 cada uno de R₂, R₃, R₄ y R₅, independientemente, es H, alquilo C₁₋₄ o acilo, o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

(ii) los compuestos descritos en el documento WO 02/18395, por ejemplo un compuesto de fórmula IIa o IIb



10 donde X_a es O, S, NR_{1s} o un grupo -(CH₂)_{na}-, estando dicho grupo sustituido o no sustituido por 1 a 4 halógenos; n_a es 1 o 2, R_{1s} es H o alquilo(C₁₋₄), estando dicho alquilo sustituido o no sustituido por un halógeno, R_{1a} es H, OH, alquilo(C₁₋₄) o Oalquilo(C₁₋₄) donde el alquilo está sustituido o no sustituido por 1 a 3 halógenos; R_{1b} es H, OH o alquilo(C₁₋₄), donde el alquilo está sustituido o no sustituido por un halógeno; cada R_{2a} se selecciona independientemente de H o alquilo(C₁₋₄), estando dicho alquilo sustituido o no sustituido por un halógeno; R_{3a} es H, OH, halógeno o Oalquilo(C₁₋₄), donde el alquilo está sustituido o no sustituido por un halógeno; y R_{3b} es H, OH, halógeno, alquilo(C₁₋₄) donde el alquilo está sustituido o no sustituido por hidroxilo, o Oalquilo(C₁₋₄) donde el alquilo está sustituido o no sustituido por un halógeno; Y_a es -CH₂-, -C(O)-, -CH(OH)-, -C(=NOH)-, O o S, y R_{4a} es alquilo(C₄₋₁₄) o alquenilo(C₄₋₁₄);
 15 o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 Cuando los compuestos de fórmulas I, IIa o IIb tienen uno o más centros asimétricos, la presente invención debe entenderse que comprende los isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros individuales y sus mezclas. Los compuestos de fórmula IIa o IIb, en donde el átomo de carbono que lleva el grupo amino es asimétrico, preferiblemente tienen la configuración R para el átomo de carbono.

30 Los compuestos de fórmulas I, IIa o IIb pueden estar en forma libre o en forma de sal. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas I, IIa o IIb comprenden las sales de ácidos inorgánicos tales como hidrocloreto, hidrobromuro y sulfato; sales de ácidos orgánicos tales como acetato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, malato, metanosulfonato y bencenosulfonato; o cuando sea apropiado, las sales de metales, tales como sodio, potasio, calcio, aluminio; sales de amina tales como trietilamina; y sales de aminoácidos dibásicos, tales como lisina. Los compuestos y sus sales de la invención también abarcan hidratos y las formas solvato.

35 En las definiciones anteriores:

- acilo puede ser un residuo Ry-CO- donde Ry es alquiloC₁₋₆, cicloalquiloC₃₋₆, fenilo o fenil-alquiloC₁₋₄,
- a menos que se indique lo contrario, alquilo, alcoxi, alquenilo o alquinilo puede ser lineal o ramificado,
- arilo puede ser fenilo o naftilo, preferiblemente fenilo,
- "grupo heterocíclico" representa un grupo heterocíclico de 5 a 7 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre S, O y N. Los ejemplos de tales grupos heterocíclicos comprenden los grupos heteroarilos indicados anteriormente, y los compuestos heterocíclicos correspondientes a grupos heteroarilos parcial o totalmente hidrogenados, tales como furilo, tienilo, pirrolilo, azepinilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tiadiazolilo, piranilo, piridilo, piridazinilo,

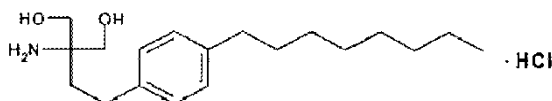
pirimidinilo, pirazinilo, tetrahidropirano, morfolinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinilo, pirrolilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, tiazolidinilo o pirazolidinilo. Los grupos heterocíclicos preferidos son grupos heteroarilo con 5 o 6 miembros y los más preferidos son los grupos morfolinilo, tiomorfolinilo o piperidinilo.

Cuando la cadena de carbono como R_1 está sustituida en los compuestos de fórmula I, esta cadena está preferiblemente sustituida por un halógeno, nitro, amino, hidroxilo o carboxi. Cuando la cadena de carbono está interrumpida por un fenileno opcionalmente sustituido, la cadena de carbono está preferiblemente no sustituida. Cuando está sustituido el radical fenileno, está preferiblemente sustituido por un halógeno, nitro, amino, metoxi, hidroxilo o carboxi.

Los compuestos preferidos de fórmula I son aquellos en los que R_1 es alquilo C_{13-20} , opcionalmente sustituido por nitro, halógeno, amino, hidroxilo o carboxi, y, más preferiblemente, aquellos donde R_1 es un fenilalquilo sustituido por una cadena alquilo C_{6-14} opcionalmente sustituido por un halógeno y el radical alquilo es un alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido por un hidroxilo. Más preferiblemente, R_1 es un fenil-alquilo C_{1-6} sustituido en el fenilo por una cadena alquilo C_{6-14} , lineal o ramificada, preferiblemente lineal. La cadena alquilo C_{6-14} puede estar en orto, meta o para, preferiblemente en para. Preferiblemente, cada uno de R_2 a R_5 es H.

Un compuesto preferido de fórmula I es el 2-amino-2-tetradecil-1,3-propanodiol.

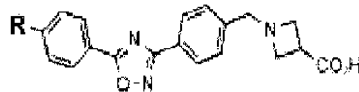
Un compuesto particularmente preferido de fórmula I es el FTY720, es decir el 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un profármaco del mismo. El compuesto es el clorhidrato de FTY720, como se muestra a continuación:



Un compuesto preferido de fórmula IIa es el FTY720-fosfato o FTY720-P (R_{2a} es H, R_{3a} es OH, X_a es O, R_{1a} y R_{1b} son OH).

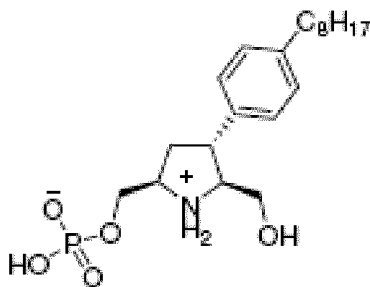
Un compuesto preferido de fórmula IIb es un compuesto de fosfato en el cual R_{2a} es H, R_{3b} es OH, X_a es O, R_{1a} y R_{1b} son OH, Y_a es O y R_{4a} es heptilo. El compuesto del grupo que comprende la esfingosina-1-fosfato, FTY720, FTY720-P, AUY954, CYM-5442, CYM-5181, SEW2871, VPC01091, DS-SG-44, KRP-203-P, DihidroS1P, el Compuesto 26, el Compuesto 12, esfingosilfosforilcolina y AFD-R. Estos compuestos son citados por Dong-Soon IM en Acta Pharmacologica Sínica (2010) 31: 1213-1222.

Por "Compuesto 26" se entiende el compuesto descrito en la publicación Li et al., "Discovery of potent 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole sphingosine-1-phosphate (SIP1) receptor agonists with exceptional selectivity against S1P2 and S1P3", Journal of Medicinal Chemistry, 2005 y que tiene la siguiente fórmula

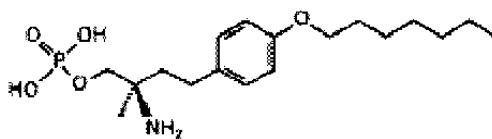


donde $R = (CH_3)_2CHCH_2-$

Por "Compuesto 12" se entiende el compuesto descrito en la publicación Hanessian et al., "Constrained azacyclic analogues of the immunomodulatory agent FTY720 as molecular probes for sphingosine 1-phosphate receptors", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007 y que tiene la siguiente fórmula:



Por AFD-R se entiende el compuesto descrito en la publicación Brinkmann et al., "The immune modulator FTY720 targets sphingosine-1-phosphate receptors", The Journal of Biological Chemistry, 2002 y que tiene la siguiente fórmula:



Preferiblemente, el compuesto es un agonista de los receptores S1PR1, S1PR3, S1PR4 y S1PR5. El compuesto de la invención es FTY720 (también conocido como "fingolimod") o FTY720-P, que es la forma fosforilada de FTY720. FTY720 y FTY720-P han sido descritos en particular por Mandala S. et al. en Science 2002; 296: 346-9 y por Brinkmann V. et al. en J Biol Chem 2002; 277: 21453-7.

El FTY720 es un sustrato de la esfingosina quinasa 2 y es, en su forma fosforilada, un agonista de los receptores S1PR1, S1PR3, S1PR4 y S1PR5.

El FTY720-P es particularmente relevante para el uso en el tratamiento de la infección por VIH. Esto es debido en parte a los efectos sinérgicos de FTY720-P en los receptores S1PR1 S1PR3, S1PR4 y S1PR5. Los inventores han demostrado el efecto protector contra la infección por VIH de este compuesto en líneas celulares, en células primarias. Por último, también se ha demostrado el efecto de esta molécula *in vivo* en ratones en los que se injertaron linfocitos humanos antes de ser infectados con el VIH. Además, los inventores mostraron que FTY720-P permitía una reducción de la infección por VIH en células que no expresan el S1PR1. Este resultado confirma que los receptores S1PR3 y/o S1PR4 y/o SPR5 también tienen un papel clave en la protección contra la infección por VIH. Los agonistas son agonistas específicos del receptor S1PR1 y al menos un receptor seleccionado de S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5.

Métodos de tratamiento

También se describen métodos de tratamiento de un sujeto que padece una infección por VIH que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto que es un agonista de al menos un receptor seleccionado entre los receptores S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 y S1PR5, y preferiblemente que es un agonista del receptor S1PR1.

Los compuestos según la invención también se pueden administrar en forma de composiciones farmacéuticas, tales como se define a continuación.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente para tratar y/o prevenir la infección por VIH.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la invención también se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones por VIH.

Así, igualmente se describen composiciones farmacéuticas para su uso en métodos de tratamiento de infecciones por VIH en seres humanos o animales, comprendiendo dichas composiciones al menos un compuesto según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Cualquier compuesto de la invención se puede combinar con cualquier tipo de vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente una matriz de difusión prolongada, tal como un polímero biodegradable, para formar una composición farmacéutica según la invención.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacción inversa, reacción alérgica o de otro modo no deseada cuando se administran a un mamífero, particularmente un ser humano. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser sólido, semisólido o líquido.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y la posología naturalmente dependen de la gravedad de la infección, su estado de desarrollo, la edad, el sexo, el peso del sujeto a tratar, etc.

Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular para administración tópica, oral, intranasal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, o similares.

Según una realización de la invención, dicha infección por VIH es una infección por el VIH-1. De acuerdo con otra realización, dicha infección por el VIH es una infección por el VIH-2.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, y no limitan el alcance de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1: Medición de la infectabilidad de las líneas HOS CCR5 LacZ y HOS CCR5 S1PR1 por el virus Ad8Luc.

La infectabilidad se mide por la actividad luciferasa. Esta figura muestra que la presencia de receptor S1PR1 inhibe la infección de la línea HOS con el virus del VIH.

Figura 2: Efecto de FTY720-P en una línea celular HOS CCR5 S1PR1.

La infectabilidad se mide por la actividad luciferasa. Esta figura muestra que la pre-incubación con FTY720-P de células que expresan S1PR1 disminuye la infección.

Figura 3: Medición de la infectabilidad en una línea HOS CCR5 que no expresa S1PR1.

Se preincubaron células HOS CCR5 lacZ durante 1 hora con:

- un agonista específico de S1PR1, el SEW2871, o
- el agonista natural de todos los receptores S1PR (S1PR1 a S1PR5), la esfingosina-1-fosfato (S1P) o
- un agonista de S1PR1, S1PR3, S1PR4 y S1PR5, el FTY720-P.

No se observó ninguna diferencia significativa con el SEW2871 mientras que el S1P y el FTY720-P permiten una disminución de aproximadamente un 50 % de la infección por el VIH.

Figura 4: Inhibición de la infección de células primarias linfocitarias por FTY720-P.

Esta figura muestra el efecto de S1PR1 y FTY720-P en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Este dato confirma el efecto de FTY720-P en células primarias.

Figura 5: Medición de la producción viral en el medio de cultivo de células primarias infectadas con un virus replicativo Ad8 y pre-incubadas con FTY720-P.

Esta figura muestra una marcada inhibición de la producción viral por las CMSP.

Figura 6: Efecto de FTY720 *in vivo*

Esta figura muestra una marcada reducción de la viremia en ratones injertados con células linfocitarias humanas e infectados por el VIH. Esta figura confirma el efecto *in vivo* de FTY720 en la prevención de la infección por el VIH.

Ejemplos

Material y métodos

Los materiales y métodos utilizados para la totalidad de la sección experimental se detallan a continuación.

Células

Se cultivan líneas HOS-CD4 (AIDS Reagent Program, Rockville, MD,) y HEK-293T (riñón embrionario humano transformado con el antígeno T del virus de simio 40 293T, Genethon) en medio DMEM suplementado con SBF (suero bovino fetal) al 10 %, Glutamax-1 10 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. La línea de células HEK-293T CD4+ CCR5+ (donación de Martine Biard-Piechaczyk, Instituto de Biología, Montpellier, Francia) se obtuvo por transfección de los genes CD4 y CCR5 a partir de la línea HEK-293T.

Se aislaron CMSP humanas en cultivo de sangre de donantes sanos mediante centrifugación de densidad en un medio de separación de linfocitos (Eurobio) y se cultivaron en medio RPMI suplementado como el DMEM a 37 °C, 5 % de CO₂.

Efecto de S1PR1 sobre la infección de la línea HEK-293T

Para probar la influencia de la expresión de S1PR1 sobre la infección por el VIH-1, se transfectaron transitoriamente 50.000 células de HEK-293T CD4+ CCR5+ mediante lipofección por incubación de las mismas durante 24 horas con una mezcla de 50 ng de plásmido CMV-S1PR1, 20 ng de plásmido pRL-TK-Renilla Luciferase (Promega) y 0,5 µl de lipofectamina (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen) en 150 µl de DMEM con SBF 10 % en placas de 96 pocillos previamente incubadas con una solución de D-policilisina durante 30 min. El clon de plásmido S1PR1 se obtuvo del Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org). Un fragmento que lleva S1PR1 se clonó bajo el control del promotor CMV en el vector de expresión pcDNA3.1+ (Invitrogen). Veinticuatro horas después de la transfección, los pocillos se lavaron con DMEM (Bio Whittaker), y las células se infectaron con 40 ng del virión Ad8-luc en 180 µl de medio de cultivo. El virión Ad8-luc es un virus pseudotipado no replicativo R5 obtenido por co-transfección de las células HEK293T con el plásmido de transferencia pNL4.3 Luc.R-E- que lleva un gen vírico *env* defectuoso, así como el gen de la luciferasa de luciérnaga insertado en el gen vírico *nef* (AIDS Reagent Program), y el plásmido pCMV-AD8-env que codifica la envoltura R5 del prototipo AD8 R5 HIV-1 (Cho, Shibata y Martin (1996) J. Virol. 70, 7318 hasta 7321). Veinticuatro horas después de la infección, las células se lavaron una vez con medio de cultivo, y se colocan en cultivo con 200 µl de DMEM, SBF 10 %. De 40 a 48 h después de la infección, las células se lavaron una vez con PBS, se lisaron con 50 µl de tampón y la actividad de luciferasa de la luciérnaga y Renilla se miden secuencialmente en un luminómetro usando el sistema Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega, Cat: E1910). La actividad luciferasa de Renilla se utiliza como una medida del nivel del metabolismo celular.

Transducción de células HOS para la expresión de CCR5 y S1PR1

Para producir vectores del VIH que expresan los genes CCR5, lacZ y S1PR1, los plásmidos pWPXL-CCR5 (Desmetz et al., 2007, Clin Immunol 123, 148-154), pHRCMV-lacZ (Naldini et al. 1996, Science 272, 263-267) y pWPXL-S1PR1 se cotransfectaron con el plásmido de empaquetamiento p8.2 y el plásmido pMD2G que codifica la envoltura del virus de la estomatitis vesicular en células 293T como se ha descrito previamente (Lin et al., 2002, PNAS 99, 15.590-15.595). Para construir el plásmido pWPXL-S1PR1, la secuencia codificante de S1PR1 se amplificó por PCR a partir del plásmido pCDNA3.1-S1PR1 y después el fragmento BamH1-Spe1 obtenido se clonó en el vector lentiviral pWPXL (addgene.org). Las células HOS fueron transducidas (Lin et al. 2002) primero con el vector HIV-CCR5 y la línea obtenida se volvió a transducir con el vector HIV-S1PR1 o el vector HIV-lacZ con cantidades iguales del virus en equivalente p24. La expresión en la membrana de los receptores CCR5 y S1PR1 se evaluó por citometría de flujo (FACScalibur, BDBiosciences) después de marcar las células con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD 195 humano (BD Pharmingen) y EDG1 anti-humano (R&D), respectivamente.

Pruebas de infección de células HOS con el virus no replicativo AD8-luc

Se cultivaron por triplicado 50.000 células HOS en placas de 96 pocillos, y después se infectaron con 50 ng de virus Ad8-luc. Veinticuatro horas después de la infección, las células se lavaron dos veces con PBS, y se colocaron en cultivo durante 48 horas. Después, las células se lavaron una vez con PBS, se lisaron con 50 µl de tampón, a continuación, la actividad luciferasa de la luciérnaga se mide en un luminómetro usando el kit Promega (Luciferase Assay System).

Pruebas de infección de CMSP con el virus replicativo AD8

Las CMSP se activan mediante incubación durante 72 h en medio de cultivo suplementado con fitohemaglutinina (PHA, 1 µg/ml) e interleucina 2 (IL2 100 U/ml), y después del lavado con RPMI, se incuban en placas de 96 pocillos por triplicado a razón de 200.000 células en 200 µl por pocillo. A continuación, se infectan con 70 ng de equivalente p24 del prototipo Ad8 HIV-1 durante 18 h, después se lavan 2X con PBS y se incuban durante 11 días mediante el ajuste del número de células en cada muestra del sobrenadante de cultivo el D4, D7 y D9. La producción de virus fue seguida en el sobrenadante de cultivo mediante la medición de la concentración de la proteína gag p24 mediante ELISA utilizando un kit comercial (Innotest VIH AG MAB Ingen, ref: 80563).

Pruebas de moléculas farmacológicas

Para las células HEK-293T CD4+ CCR5+, 24 horas después de la transfección con el plásmido S1PR1 o con el vector vacío, se incubaron las células durante 30 min y luego se infectaron con el anticuerpo anti-CCR5 a 10 µg/ml (clon 2D7, Pharmingen, ref. 555991) o con MIP-1β a 100 ng/ml (R&D systems, ref. 271-BME) o con (S)-FTY720 fosfato (FTY720-P) a 80 ng/ml (Echelon, ref. B-0721).

Para las células HOS y las CMSP, se añadieron las moléculas S1P (Enzo, vendido por Covalab ref. SL-140), FTY720-P (Echelon) o SEW2871 (Cayman, ref. 10006440) en el medio de cultivo una hora antes de la infección a las concentraciones indicadas.

Modelo animal de ratón inmunológicamente humanizado

Los ratones SCID son de genotipo cb17/lcr-Prkdc^{scid}/Crl. Estos ratones inmunocomprometidos están alojados en una instalación para animales A3/L3 en jaulas con filtro en la parte superior en un estante ventilado. Después de una semana de aclimatación, los animales son reconstituidos mediante inyección intraperitoneal de 30.10⁶ CMSP obtenidas por centrifugación de densidad en los leucocitos de un anillo de aféresis no calificada de un donante voluntario sano. La reconstrucción se evalúa el día 13 mediante el ensayo de la inmunoglobulina (Ig) presente en el suero humano de los ratones mediante el ensayo Elisa usando anticuerpo anti-Ig-PO completa humana (MP Biomedical, N.º cat. 55230). Los ratones con una concentración total de Ig superior a 100 µg/ml se mantienen para el experimento y se infectan 14 días después de la reconstitución con la cepa JR-CSF del VIH-1 (cepa R5) a 1000 TCID₅₀ en 100 µl. Un día antes de la infección se inicia la aplicación de una sonda nasogástrica diariamente con 100 µl de FTY720 (Cayman, vendido por Interchim ref. BM8045) disuelto a 60 µg/ml en agua destilada y se continúa durante 12 días. Los ratones no tratados reciben por sonda el mismo volumen de agua destilada. Se extraen 50 µl de sangre retro-orbital y se diluyen con 1 ml de plasma humano para determinar la carga viral en los días 6, 9 y 12 después de la infección después de la anestesia con isoflurano. La viremia se evaluó mediante la cuantificación del ARN viral en plasma de ratón con la prueba de qPCR AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 (Roche Diagnostics, ref. 05212294190). Los valores por debajo de 20 copias de ARN/ml (o 400 copias/ml de suero de ratón) inferiores al umbral de detección del kit se considera igual a cero.

Prueba de TR-FRET

La secuencia de codificación de S1PR1 se amplificó por PCR a partir del segundo codón hasta el codón de parada entre los sitios Mlu1 y Xba1 y después se inserta con la ayuda de estos sitios de restricción en los plásmidos pRK5-

HA-SNAP-mGlu2 y pRK5-FLAG-CLIP-mGlu2 (Doumazane, E. et al., FASEB J. 2010 Sep 27) en lugar del gen mGlu2, de manera que el receptor S1PR1 se fusiona en el extremo terminal N o con un epítipo de la hemaglutinina (HA) y la enzima SNAP o con un epítipo FLAG y la enzima CLIP, insertada detrás de un péptido señal.

5 Las células HEK293 se transfectaron mediante lipofección con ADN de los plásmidos CLIP-CCR5 (7 ng por cada 100.000 células) y SNAP-GPCR (intervalo de 1 a 100 ng por cada 100.000 células) y se sembraron a razón de 100.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos negras pre-incubadas con una solución de poliornitina. Veinticuatro a 30h después de la transfección, las células adherentes se lavan y después se incuban con medio de cultivo que contiene los sustratos de las enzimas SNAP y CLIP acopladas a fluoróforos durante 2 horas a 37 °C. Los
10 fluoróforos son el Lumi4@-criptato de terbio unido a O⁶-bencilguanina (BG-Lumi4) utilizada a 0,3 µM, y la fluoresceína unida a la O²-bencilcitosina (BC-fluoresceína) utilizada a 1 µM, sustratos de las enzimas SNAP y CLIP, respectivamente. BG-Lumi4 y BC-fluoresceína proceden de Cisbio Bioessays (Bagnols-sur-Cèze, Francia). En estas condiciones, el marcaje de los receptores por los fluoróforos es específico de SNAP o CLIP, total (100 % de los receptores están marcados) y está restringido a los receptores presentes en la superficie celular (Doumazane, E. et al., FASEB J. 2010 Sep 27). Además, las intensidades de fluorescencia de Lumi4 y de la fluoresceína son proporcionales al número de receptores presentes en la superficie celular (Doumazane, E. et al., FASEB J. 2010 Sep 27). A continuación, las células se lavaron 4 veces con tampón de Tris-Krebs a 37 °C (Maurel, D. et al., 2008, Nat. Methods 5:561-567). La fluorescencia y el TR-FRET se miden en 100 µl de tampón de Tris-Krebs en un espectrofluorímetro Infinite F500 (Tecan, Männedorf, Suiza) con los siguientes parámetros: Lumi4 (excitación a 320 nm, emisión a 620 nm, 150 µseg de retardo y 500 µseg de tiempo de integración), fluoresceína (excitación a 485 nm, emisión a 520 nm, 0 µseg de retardo y 1000 µseg de tiempo de integración) trFRET (excitación a 320 nm, emisión a 520 nm, 150 µseg de retardo y 500 µseg de tiempo de integración). La señal de FRET se corrige restando la FRET no específica obtenida después de la transfección de solo el receptor SNAP y FRET no específica obtenida con el único sustrato BG-Lumi4. Los valores de fluorescencia de Lumi4 y de la fluoresceína se corrigen sustrayendo la señal no
20 específica medida después de la transfección de un plásmido vacío.

RESULTADOS

I. Efecto de los agonistas de la invención en las líneas HEK293T que expresan los receptores CD4 CCR5

Estudio de la capacidad S1PR1 para interferir con la infección por el VIH

El gen que codifica S1PR1 se clonó en un vector de expresión bajo el control del promotor del CMV. Se utilizó una línea HEK293T que expresa los receptores CD4 CCR5 constitutivamente y en un nivel suficiente para permitir la
35 infección.

Los resultados mostraron que cuando se introduce un plásmido que permite la expresión del receptor de membrana S1PR1 en esta línea, el nivel de infección se reduce por un factor de aproximadamente dos en comparación con el control (plásmido vacío). Como era de esperar, la adición de un plásmido CCR5 que aumenta el nivel de membrana del co-receptor del VIH dio un mayor nivel de control de la infección. En estos experimentos, se controla que el efecto sobre la infección de los plásmidos CCR5 y S1PR1 no tenga un efecto global sobre el metabolismo celular.

Efecto sobre la infección de la estimulación del receptor S1PR1 por el agonista de FTY720-P

Una vez demostrada la capacidad de S1PR1 de interferir con la infección por VIH, probamos el efecto de un agonista de S1PR1 sobre la infección por VIH, usando el mismo método, pero incluyendo una etapa de incubación de células con el agonista a ensayar justo antes de la infección.

Los resultados muestran que en presencia del receptor S1PR1 no estimulado, la infección se reduce en un 60 % comparado con el control de plásmido vacío y que en presencia del receptor S1PR1 estimulado por el agonista de FTY720-P durante 30 min antes de la adición del virus, la infección se reduce en un 90 % comparado con el control de plásmido vacío. Esta reducción de la infección con FTY720-P es del mismo nivel que la obtenida en este experimento cuando se incuban las células en las mismas condiciones con un anticuerpo anti-CCR5 o con un ligando de CCR5 (MIP1-β), los cuales se sabe que inhiben la infección por el VIH (Wu, L. et al., 1997, J Exp Med 186 :1373-1381; Cocchi, F. et al., 1995, Science 270 (5243) :1811-1815).

Demostración de una heterodimerización de S1PR1 con CCR5 mediante la técnica de HTRF

Los RAPG pueden actuar como homodímeros, pero también mediante interacciones heterodiméricas. Para aclarar el mecanismo por el cual S1PR1 inhibe la infección, hemos probado su capacidad para heterodimerizarse con CCR5. Para ello, se utilizó una tecnología de TR-FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo), HTRF (<http://www.htrf.com/technology/>). En esta tecnología, que combina los principios de la TRF (Fluorescencia Resuelta en el Tiempo) y de la FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia), cada uno de los receptores CCR5 y S1PR1 se expresa en la superficie de la membrana como una fusión traduccional con las enzimas SNAP y CLIP, respectivamente, lo que permite la unión específica e irreversible de dos fluoróforos acoplados a los sustratos de estas enzimas. Una señal FRET se detecta cuando los dos
60
65

fluoróforos son compatibles con distancias de heterodimerización entre los receptores.

Los resultados mostraron que la señal de FRET obtenida entre los receptores S1PR1 y CCR5 es comparable a la obtenida para el homodímero de CCR5, lo que demuestra una interacción directa entre la membrana y CCR5 y S1PR1, probablemente dentro de un complejo heterodímero.

II. Efecto de los agonistas de la invención en las líneas HOS-CD4

Los inventores han confirmado los resultados iniciales obtenidos en las líneas HEK293T que expresan los receptores CD4 CCR5 con células HOS-CD4.

La expresión de S1PR1 inhibe la infección de una línea HOS por el VIH

Una línea HOS (sarcoma osteohumano) que expresa el receptor CD4 fue transducida por un vector lentiviral que permite la expresión constitutiva del co-receptor CCR5 en la membrana plasmática para que sea infectable por el virus VIH-1. Esta línea HOS CCR5 se transduce de nuevo para obtener la expresión en la membrana del receptor S1PR1 (HOS CCR5 S1PR1). En paralelo, se obtiene una línea transducida con el gen lacZ (HOS CCR5 lacZ) por el mismo procedimiento de control de la infectabilidad.

Estas dos líneas se infectan con diferentes dosis de virus Ad8-luc y su infectabilidad se evalúa 72 horas después de la infección mediante la medición de la actividad luciferasa (Figura 1).

Por tanto, se constata que la mera presencia del receptor S1PR1 inhibe la infección de la línea celular HOS por el VIH. Este efecto es muy pronunciado, teniendo en cuenta que se trata de un virus “de una sola ronda” y por lo tanto solo efectúa un ciclo de replicación. Este resultado confirma los resultados previamente presentados en la línea HEK293 donde se utilizó el virus en una sola dosis.

FTY720-P mejora la inhibición de la infección de la línea celular HOS CCR5 S1PR1

Se expusieron células HOS CCR5 S1PR1 durante una hora a FTY720-P (33 μ M) y después se infectaron como antes (Figura 2).

En este experimento, la pre-incubación con FTY720-P de células que expresan el receptor S1PR1 disminuyó la infección un 80 % más, además de la inhibición observada en presencia de S1PR1 no estimulado.

FTY720-P inhibe la infección de la línea celular HOS CCR5 en ausencia de S1PR1

En este experimento, los inventores probaron el efecto de diferentes agonistas de los receptores S1PR sobre la infección por la cepa Ad8-luc de la línea HOS CCR5 que no expresa S1PR1.

Para ello, se preincubaron células HOS CCR5 lacZ durante 1 hora, con un agonista específico de S1PR1, el SEW2871 (33 μ M) o el agonista natural de todos los receptores S1PR (S1PR1 a S1PR5), la esfingosina-1 fosfato (S1P, 33 μ M) o el FTY720-P (33 μ M), que es agonista de S1PR1, S1PR3, S1PR4 y S1PR5 (Figura 3).

En principio, parece que el SEW2871 no altera significativamente la infección en este experimento. Este era el resultado esperado teniendo en cuenta que esta línea no expresa el S1PR1.

Por el contrario, el S1P y el FTY720 disminuyen la infección media en aproximadamente el 50 %, y esto de manera muy significativa (prueba de Student, $p < 0,01$). Por lo tanto, se demuestra además que la estimulación de S1PR1 disminuye la infección de una línea que expresa este receptor en su superficie, que los agonistas de los receptores S1PR2 a S1PR5 también tienen un efecto protector de la infección.

III. Inhibición de la infección de células primarias linfocitarias por el FTY720-P

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas de un donante sano se preincubaron en presencia de FTY720-P a 1 μ M o S1P a 1 μ M, y después se infectaron con virus Ad8-luc durante 72 horas antes de medir la actividad luciferasa. Los resultados mostraron una inhibición de aproximadamente el 60 % de la infección por estos dos agonistas (Figura 4). La expresión del receptor S1PR1 en la superficie de las CMSP no se detectó por citometría de flujo (a pesar de la presencia de ARNm en estas células).

Por tanto, es probable que el efecto de estos agonistas se deba a la estimulación de al menos otro receptor S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5.

Este resultado confirma el hecho de que la inhibición de la infección por FTY720-P no se debe solo a su efecto sobre S1PR1.

Para confirmar este efecto sobre las células primarias, se preincubaron CMSP de donantes sanos con FTY720-P a 1 μ M durante una hora y luego se infectaron con virus replicativo Ad8. La cantidad de virus producido en el medio de cultivo se evaluó mediante la medición de la proteína p24 viral los días 4, 7, 9 y 11 después de la infección (Figura 5).

5 Se observa una marcada inhibición de la producción viral por CMSP, que alcanzó el 77 % en promedio en el noveno día.

10 Por lo tanto, los inventores han demostrado el efecto de los agonistas de la esfingosina-1-fosfato tanto en líneas celulares como en células primarias.

IV. Prueba de la eficacia de la actividad anti-VIH de FTY720 *in vivo*

15 Este experimento permite confirmar *in vivo* en el modelo de ratón SCID humanizado (hu-PBL-SCID) e infectados por el VIH-1, la actividad anti-VIH de FTY720 mostrada previamente *in vitro* en las líneas o células primarias.

Dos grupos de animales se compararon frente a la infección por el VIH; un grupo control de ocho animales no tratados y un grupo de seis animales tratados con FTY720. El experimento se realizó como sigue:

- 20 > D-21: Recepción de los ratones en el animalario A3 y adaptación de una semana en este entorno.
- > D-14: Reconstitución inmunitaria de los animales mediante inyección intraperitoneal de CMSP humanas.
- > D-1: Evaluación del injerto inmunitario y constitución de dos grupos de ratones con una distribución de ratones reconstituidos comparable. Inicio del tratamiento. Sonda nasogástrica con FTY720 a 0,3 mg por kg por día o vehículo, después sonda nasogástrica diariamente durante 15 días.
- 25 > D0: Infección de los ratones con virus VIH-1 de tipo 5.
- > D6, 9, 12: Determinación de la carga viral y sacrificio de los animales en el D12.

30 El valor medio de la viremia para cada uno de los dos grupos se muestra en la Figura 6 (*: prueba de Student, la corrección de Welch). Se observa una disminución significativa ($p = 0,023$) de la infección de los animales tratados. Este experimento confirma el efecto antiviral de FTY720 sobre el VIH *in vivo*, en el modelo de ratón "humanizado".

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> François, Vincent

<120> Inhibidores de las infecciones por el VIH y sus usos

<130> BCT 110459 QT

40 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

45 <210> 1

<211> 382

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 1

ES 2 655 495 T3

Met Gly Pro Thr Ser Val Pro Leu Val Lys Ala His Arg Ser Ser Val
 1 5 10 15

Ser Asp Tyr Val Asn Tyr Asp Ile Ile Val Arg His Tyr Asn Tyr Thr
 20 25 30

Gly Lys Leu Asn Ile Ser Ala Asp Lys Glu Asn Ser Ile Lys Leu Thr
 35 40 45

Ser Val Val Phe Ile Leu Ile Cys Cys Phe Ile Ile Leu Glu Asn Ile
 50 55 60

Phe Val Leu Leu Thr Ile Trp Lys Thr Lys Lys Phe His Arg Pro Met
 65 70 75 80

Tyr Tyr Phe Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ala Gly Val
 85 90 95

Ala Tyr Thr Ala Asn Leu Leu Leu Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Lys Leu
 100 105 110

Thr Pro Ala Gln Trp Phe Leu Arg Glu Gly Ser Met Phe Val Ala Leu
 115 120 125

Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile Glu Arg Tyr Ile
 130 135 140

Thr Met Leu Lys Met Lys Leu His Asn Gly Ser Asn Asn Phe Arg Leu
 145 150 155 160

Phe Leu Leu Ile Ser Ala Cys Trp Val Ile Ser Leu Ile Leu Gly Gly
 165 170 175

ES 2 655 495 T3

Leu Pro Ile Met Gly Trp Asn Cys Ile Ser Ala Leu Ser Ser Cys Ser
 180 185 190

Thr Val Leu Pro Leu Tyr His Lys His Tyr Ile Leu Phe Cys Thr Thr
 195 200 205

Val Phe Thr Leu Leu Leu Leu Ser Ile Val Ile Leu Tyr Cys Arg Ile
 210 215 220

Tyr Ser Leu Val Arg Thr Arg Ser Arg Arg Leu Thr Phe Arg Lys Asn
 225 230 235 240

Ile Ser Lys Ala Ser Arg Ser Ser Glu Lys Ser Leu Ala Leu Leu Lys
 245 250 255

Thr Val Ile Ile Val Leu Ser Val Phe Ile Ala Cys Trp Ala Pro Leu
 260 265 270

Phe Ile Leu Leu Leu Leu Asp Val Gly Cys Lys Val Lys Thr Cys Asp
 275 280 285

Ile Leu Phe Arg Ala Glu Tyr Phe Leu Val Leu Ala Val Leu Asn Ser
 290 295 300

Gly Thr Asn Pro Ile Ile Tyr Thr Leu Thr Asn Lys Glu Met Arg Arg
 305 310 315 320

Ala Phe Ile Arg Ile Met Ser Cys Cys Lys Cys Pro Ser Gly Asp Ser
 325 330 335

Ala Gly Lys Phe Lys Arg Pro Ile Ile Ala Gly Met Glu Phe Ser Arg
 340 345 350

Ser Lys Ser Asp Asn Ser Ser His Pro Gln Lys Asp Glu Gly Asp Asn
 355 360 365

Pro Glu Thr Ile Met Ser Ser Gly Asn Val Asn Ser Ser Ser
 370 375 380

<210> 2
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Asn Lys Val Gln Glu
 1 5 10 15

5

10

ES 2 655 495 T3

His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Glu Thr Gln Glu Thr Thr Ser
 20 25 30

Arg Gln Val Ala Ser Ala Phe Ile Val Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val
 35 40 45

Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe
 50 55 60

His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu
 65 70 75 80

Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly Ser Val
 85 90 95

Thr Leu Arg Leu Thr Pro Val Gln Trp Phe Ala Arg Glu Gly Ser Ala
 100 105 110

Phe Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 115 120 125

Glu Arg His Val Ala Ile Ala Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Lys
 130 135 140

Ser Cys Arg Met Leu Leu Leu Ile Gly Ala Ser Trp Leu Ile Ser Leu
 145 150 155 160

Val Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Gly His Leu
 165 170 175

Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys His Tyr Val Leu
 180 185 190

Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Ile Ile Leu Leu Ala Ile Val Ala Leu
 195 200 205

Tyr Val Arg Ile Tyr Cys Val Val Arg Ser Ser His Ala Asp Met Ala
 210 215 220

Ala Pro Gln Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val Thr Ile Val Leu Gly
 225 230 235 240

Val Phe Ile Val Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Leu Leu Asp
 245 250 255

Tyr Ala Cys Pro Val His Ser Cys Pro Ile Leu Tyr Lys Ala His Tyr
 260 265 270

ES 2 655 495 T3

Phe Phe Ala Val Ser Thr Leu Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr
 275 280 285

Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val Leu Arg Pro Leu Gln
 290 295 300

Cys Trp Arg Pro Gly Val Gly Val Gln Gly Arg Arg Arg Gly Gly Thr
 305 310 315 320

Pro Gly His His Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser Ser Leu Glu Arg
 325 330 335

Gly Met His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val
 340 345 350

Val

<210> 3
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Met Ala Thr Ala Leu Pro Pro Arg Leu Gln Pro Val Arg Gly Asn Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Arg Glu His Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu Ala Gly Arg Leu
 20 25 30

Lys Glu Ala Ser Glu Gly Ser Thr Leu Thr Thr Val Leu Phe Leu Val
 35 40 45

Ile Cys Ser Phe Ile Val Leu Glu Asn Leu Met Val Leu Ile Ala Ile
 50 55 60

Trp Lys Asn Asn Lys Phe His Asn Arg Met Tyr Phe Phe Ile Gly Asn
 65 70 75 80

Leu Ala Leu Cys Asp Leu Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Lys Val Asn Ile
 85 90 95

Leu Met Ser Gly Lys Lys Thr Phe Ser Leu Ser Pro Thr Val Trp Phe
 100 105 110

Leu Arg Glu Gly Ser Met Phe Val Ala Leu Gly Ala Ser Thr Cys Ser
 115 120 125

10

ES 2 655 495 T3

Leu Leu Ala Ile Ala Ile Glu Arg His Leu Thr Met Ile Lys Met Arg
 130 135 140

Pro Tyr Asp Ala Asn Lys Arg His Arg Val Phe Leu Leu Ile Gly Met
 145 150 155 160

Cys Trp Leu Ile Ala Phe Thr Leu Gly Ala Leu Pro Ile Leu Gly Trp
 165 170 175

Asn Cys Leu His Asn Leu Pro Asp Cys Ser Thr Ile Leu Pro Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Lys Tyr Ile Ala Phe Cys Ile Ser Ile Phe Thr Ala Ile Leu
 195 200 205

Val Thr Ile Val Ile Leu Tyr Ala Arg Ile Tyr Phe Leu Val Lys Ser
 210 215 220

Ser Ser Arg Lys Val Ala Asn His Asn Asn Ser Glu Arg Ser Met Ala
 225 230 235 240

Leu Leu Arg Thr Val Val Ile Val Val Ser Val Phe Ile Ala Cys Trp
 245 250 255

Ser Pro Leu Phe Ile Leu Phe Leu Ile Asp Val Ala Cys Arg Val Gln
 260 265 270

Ala Cys Pro Ile Leu Phe Lys Ala Gln Trp Phe Ile Val Leu Ala Val
 275 280 285

Leu Asn Ser Ala Met Asn Pro Val Ile Tyr Thr Leu Ala Ser Lys Glu
 290 295 300

Met Arg Arg Ala Phe Phe Arg Leu Val Cys Asn Cys Leu Val Arg Gly
 305 310 315 320

Arg Gly Ala Arg Ala Ser Pro Ile Gln Pro Ala Leu Asp Pro Ser Arg
 325 330 335

Ser Lys Ser Ser Ser Ser Asn Asn Ser Ser His Ser Pro Lys Val Lys
 340 345 350

Glu Asp Leu Pro His Thr Ala Pro Ser Ser Cys Ile Met Asp Lys Asn
 355 360 365

Ala Ala Leu Gln Asn Gly Ile Phe Cys Asn
 370 375

ES 2 655 495 T3

<210> 4
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

```

Met Asn Ala Thr Gly Thr Pro Val Ala Pro Glu Ser Cys Gln Gln Leu
 1          5          10          15

Ala Ala Gly Gly His Ser Arg Leu Ile Val Leu His Tyr Asn His Ser
 20          25          30

Gly Arg Leu Ala Gly Arg Gly Gly Pro Glu Asp Gly Gly Leu Gly Ala
 35          40          45

Leu Arg Gly Leu Ser Val Ala Ala Ser Cys Leu Val Val Leu Glu Asn
 50          55          60

Leu Leu Val Leu Ala Ala Ile Thr Ser His Met Arg Ser Arg Arg Trp
 65          70          75          80

Val Tyr Tyr Cys Leu Val Asn Ile Thr Leu Ser Asp Leu Leu Thr Gly
 85          90          95

Ala Ala Tyr Leu Ala Asn Val Leu Leu Ser Gly Ala Arg Thr Phe Arg
100          105          110

Leu Ala Pro Ala Gln Trp Phe Leu Arg Glu Gly Leu Leu Phe Thr Ala
115          120          125

Leu Ala Ala Ser Thr Phe Ser Leu Leu Phe Thr Ala Gly Glu Arg Phe
130          135          140

Ala Thr Met Val Arg Pro Val Ala Glu Ser Gly Ala Thr Lys Thr Ser
145          150          155          160

Arg Val Tyr Gly Phe Ile Gly Leu Cys Trp Leu Leu Ala Ala Leu Leu
165          170          175

Gly Met Leu Pro Leu Leu Gly Trp Asn Cys Leu Cys Ala Phe Asp Arg
180          185          190

Cys Ser Ser Leu Leu Pro Leu Tyr Ser Lys Arg Tyr Ile Leu Phe Cys
195          200          205

Leu Val Ile Phe Ala Gly Val Leu Ala Thr Ile Met Gly Leu Tyr Gly
210          215          220
  
```

ES 2 655 495 T3

Ala Ile Phe Arg Leu Val Gln Ala Ser Gly Gln Lys Ala Pro Arg Pro
225 230 235 240

Ala Ala Arg Arg Lys Ala Arg Arg Leu Leu Lys Thr Val Leu Met Ile
245 250 255

Leu Leu Ala Phe Leu Val Cys Trp Gly Pro Leu Phe Gly Leu Leu Leu
260 265 270

Ala Asp Val Phe Gly Ser Asn Leu Trp Ala Gln Glu Tyr Leu Arg Gly
275 280 285

Met Asp Trp Ile Leu Ala Leu Ala Val Leu Asn Ser Ala Val Asn Pro
290 295 300

Ile Ile Tyr Ser Phe Arg Ser Arg Glu Val Cys Arg Ala Val Leu Ser
305 310 315 320

Phe Leu Cys Cys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Met Arg Gly Pro Gly Asp
325 330 335

Cys Leu Ala Arg Ala Val Glu Ala His Ser Gly Ala Ser Thr Thr Asp
340 345 350

Ser Ser Leu Arg Pro Arg Asp Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Leu Ser
355 360 365

Phe Arg Met Arg Glu Pro Leu Ser Ser Ile Ser Ser Val Arg Ser Ile
370 375 380

<210> 5
<211> 310
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

Met Glu Ser Gly Leu Leu Arg Pro Ala Pro Val Ser Glu Val Ile Val
1 5 10 15

Leu His Tyr Asn Tyr Thr Gly Lys Leu Arg Gly Ala Arg Tyr Gln Pro
20 25 30

Gly Ala Gly Leu Arg Ala Asp Ala Val Val Cys Leu Ala Val Cys Ala
35 40 45

Phe Ile Val Leu Glu Asn Leu Ala Val Leu Leu Val Leu Gly Arg His
50 55 60

10

ES 2 655 495 T3

Pro Arg Phe His Ala Pro Met Phe Leu Leu Leu Gly Ser Leu Thr Leu
 65 70 75 80
 Ser Asp Leu Leu Ala Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Asn Ile Leu Leu Ser
 85 90 95
 Gly Pro Leu Thr Leu Lys Leu Ser Pro Ala Leu Trp Phe Ala Arg Glu
 100 105 110
 Gly Gly Val Phe Val Ala Leu Thr Ala Ser Val Leu Ser Leu Leu Ala
 115 120 125
 Ile Ala Leu Glu Arg Ser Leu Thr Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Pro
 130 135 140
 Val Ser Ser Arg Gly Arg Thr Leu Ala Met Ala Ala Ala Ala Trp Gly
 145 150 155 160
 Val Ser Leu Leu Leu Gly Leu Leu Pro Ala Leu Gly Trp Asn Cys Leu
 165 170 175
 Gly Arg Leu Asp Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys Ala
 180 185 190
 Tyr Val Leu Phe Cys Val Leu Ala Phe Val Gly Ile Leu Ala Ala Ile
 195 200 205
 Cys Ala Leu Tyr Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ala His Ala Gln Arg Gly
 210 215 220
 Ala Pro Gly Leu Cys Gly Met Leu Gly Pro Pro His Pro Ala Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Arg Gly Val Pro Gly Ala His Leu Ser Cys Thr Pro Ala Gly
 245 250 255
 Arg Ser Leu Pro Gly Thr Gly His Gly Gln Leu Thr Ser Glu Pro His
 260 265 270
 His Leu His Ala His Gln Pro Arg Pro Ala Pro Arg Ala Pro Ala Pro
 275 280 285
 Gly Leu Leu Arg Thr Pro Leu Leu Arg Gln Arg Pro Glu Trp Leu Pro
 290 295 300
 Ala Val Gly Glu Arg Gly
 305 310

ES 2 655 495 T3

<210> 6
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

Met Glu Ser Gly Leu Leu Arg Pro Ala Pro Val Ser Glu Val Ile Val
 1 5 10 15

Leu His Tyr Asn Tyr Thr Gly Lys Leu Arg Gly Ala Arg Tyr Gln Pro
 20 25 30

Gly Ala Gly Leu Arg Ala Asp Ala Val Val Cys Leu Ala Val Cys Ala
 35 40 45

Phe Ile Val Leu Glu Asn Leu Ala Val Leu Leu Val Leu Gly Arg His
 50 55 60

Pro Arg Phe His Ala Pro Met Phe Leu Leu Leu Gly Ser Leu Thr Leu
 65 70 75 80

Ser Asp Leu Leu Ala Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Asn Ile Leu Leu Ser
 85 90 95

Gly Pro Leu Thr Leu Lys Leu Ser Pro Ala Leu Trp Phe Ala Arg Glu
 100 105 110

Gly Gly Val Phe Val Ala Leu Thr Ala Ser Val Leu Ser Leu Leu Ala
 115 120 125

Ile Ala Leu Glu Arg Ser Leu Thr Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Pro
 130 135 140

Val Ser Ser Arg Gly Arg Thr Leu Ala Met Ala Ala Ala Ala Trp Gly
 145 150 155 160

Val Ser Leu Leu Leu Gly Leu Leu Pro Ala Leu Gly Trp Asn Cys Leu
 165 170 175

Gly Arg Leu Asp Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys Ala
 180 185 190

Tyr Val Leu Phe Cys Val Leu Ala Phe Val Gly Ile Leu Ala Ala Ile
 195 200 205

Cys Ala Leu Tyr Ala Arg Ile Tyr Cys Gln Val Arg Ala Asn Ala Arg

ES 2 655 495 T3

210	215	220													
Arg 225	Leu	Pro	Ala	Arg	Pro 230	Gly	Thr	Ala	Gly	Thr 235	Thr	Ser	Thr	Arg	Ala 240
Arg	Arg	Lys	Pro	Arg 245	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu 250	Arg	Thr	Leu	Ser	Val 255	Val
Leu	Leu	Ala	Phe 260	Val	Ala	Cys	Trp	Gly 265	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu 270	Leu	Leu
Leu	Asp	Val 275	Ala	Cys	Pro	Ala	Arg 280	Thr	Cys	Pro	Val	Leu 285	Leu	Gln	Ala
Asp 290	Pro	Phe	Leu	Gly	Leu	Ala 295	Met	Ala	Asn	Ser	Leu 300	Leu	Asn	Pro	Ile
Ile 305	Tyr	Thr	Leu	Thr	Asn 310	Arg	Asp	Leu	Arg	His 315	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu 320
Val	Cys	Cys	Gly	Arg 325	His	Ser	Cys	Gly	Arg 330	Asp	Pro	Ser	Gly	Ser 335	Gln
Gln	Ser	Ala	Ser 340	Ala	Ala	Glu	Ala	Ser 345	Gly	Gly	Leu	Arg	Arg 350	Cys	Leu
Pro	Pro	Gly 355	Leu	Asp	Gly	Ser	Phe 360	Ser	Gly	Ser	Glu 365	Arg	Ser	Ser	Pro
Gln 370	Arg	Asp	Gly	Leu	Asp	Thr 375	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly 380	Ser	Pro	Gly	Ala
Pro 385	Thr	Ala	Ala	Arg	Thr 390	Leu	Val	Ser	Glu	Pro 395	Ala	Ala	Asp		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto que es un agonista de al menos un receptor seleccionado entre los receptores S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 y S1PR5 para su uso en un método de tratamiento de una infección por el VIH en seres humanos, **caracterizado por que** dicho compuesto es FTY720 o FTY720-P.
- 10 2. Composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de una infección por el VIH en seres humanos, comprendiendo dicha composición un compuesto como se define en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, o composición destinada a ser utilizada según la reivindicación 2, siendo dicha infección por el VIH una infección por el VIH-1.
4. Compuesto destinado a ser utilizado según la reivindicación 1 o composición destinada a ser utilizada según la reivindicación 2, siendo dicha infección por el VIH una infección por el VIH-2.

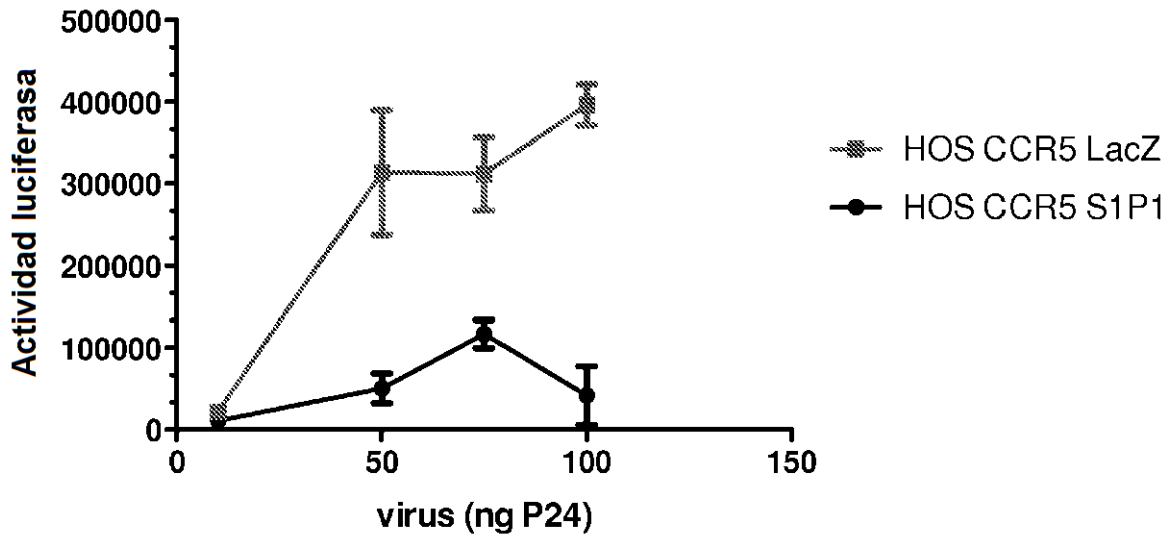


FIGURA 1

HOS CCR5 S1P1

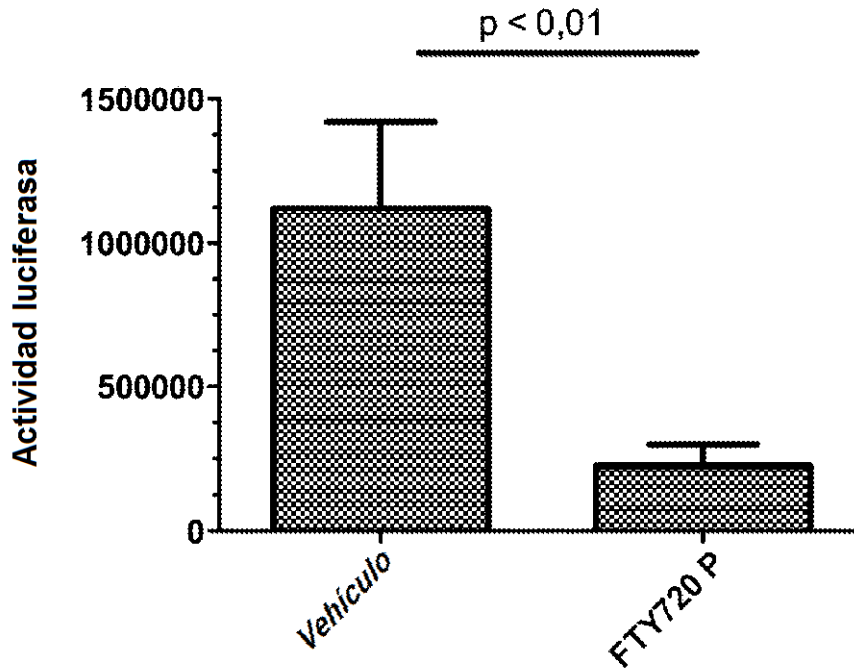


FIGURA 2

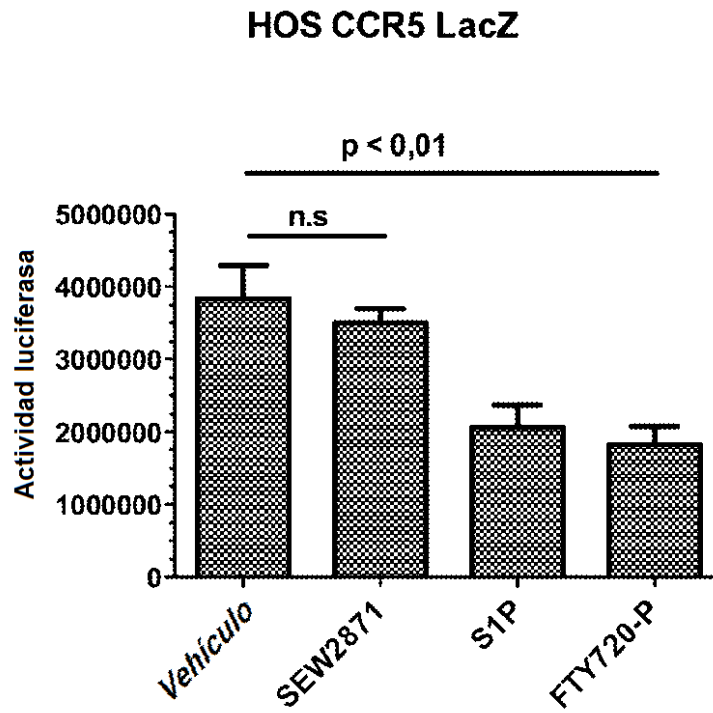


FIGURA 3

CMSP - infección con un virus no replicativo

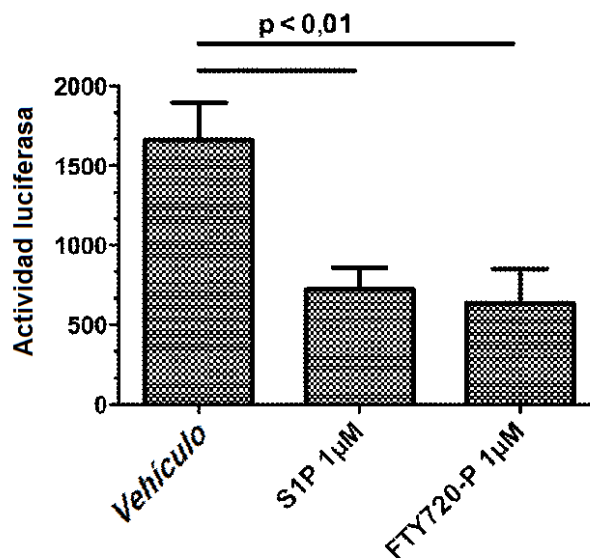


FIGURA 4

CMSP - infección con un virus no replicativo

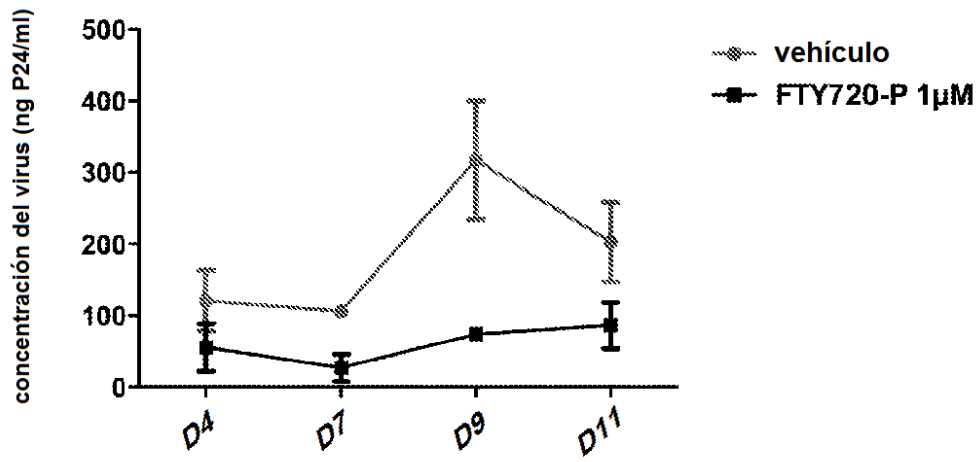


FIGURA 5

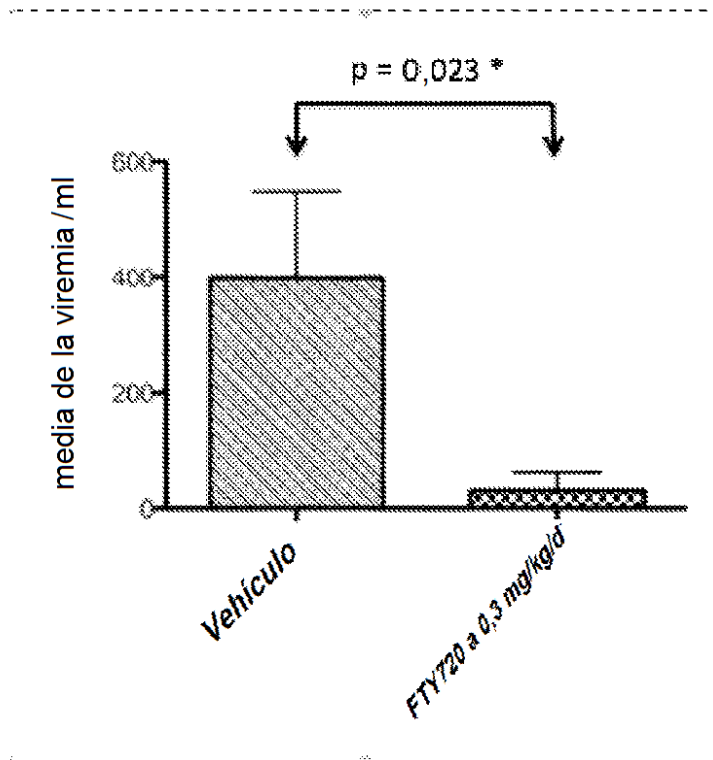


FIGURA 6